

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06040938 A**

(43) Date of publication of application **15 . 02 . 94**

(51) Int. Cl.

A61K 37/24
A61K 31/725

(21) Application number: **04213438**

(22) Date of filing: **17 . 07 . 92**

(71) Applicant:

**NAKAMURA
TOSHIICHI SUGIYAMA
YUICHI SUMITOMO
PHARMACEUT CO LTD**

(72) Inventor:

**NAKAMURA TOSHIICHI
SUGIYAMA YUICHI
HANANO MANABU**

(54) **HGF-CONTAINING PHARMACEUTICAL
PREPARATION**

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a medicinal pharmaceutical preparation capable of carrying out prolongation of acting time of HGF (hepatocyte growth factor).

CONSTITUTION: The pharmaceutical preparation

contains HGF and heparin. Since the HGF-containing pharmaceutical preparation which is effective and long acting at low dosage can reduce administration frequency and amount, relief from patient's pain and reduction of medical expenses can be carried out.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO&Japio

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-40938

(43)公開日 平成6年(1994)2月15日

技術表示箇所

(51)Int.Cl.⁵

A 6 1 K 37/24
31/725

識別記号
A C S

庁内整理番号
8314-4C
8314-4C

F I

審査請求 未請求 請求項の数4(全 8 頁)

(21)出願番号 特願平4-213438

(22)出願日 平成4年(1992)7月17日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年3月5日
日本薬学会第112年会組織委員会発行の「日本薬学会第
112年会講演要旨集」に発表

(71)出願人 591115073

中村 敏一
大阪府高槻市高見台10-27

(71)出願人 592173607

杉山 雄一
東京都武蔵野市西久保3丁目4番10号

(71)出願人 000183370

住友製薬株式会社
大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(72)発明者 中村 敏一

福岡市東区みどりヶ丘3丁目11番6号

(74)代理人 弁理士 廣瀬 孝美

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 HGF含有製剤

(57)【要約】

【目的】 HGF(肝細胞増殖因子)の作用時間の持続性を図ることができる医薬製剤を提供することを目的とする。

【構成】 本発明の医薬製剤は、HGFとヘパリンとを含有することからなる。本発明によれば、低用量で有効な持続性のあるHGF含有医薬品が得られ、投与回数及び投与量を低減できるので、患者の苦痛の緩和、医療費の低減などを図ることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 HGFとヘパリンを含有すること
を特徴とする医薬製剤。

【請求項2】 HGFが、ヒト又は動物の組織又
は血液成分由来である請求項1記載の医薬製剤。

【請求項3】 HGFが、遺伝子組換えにより製造
したものである請求項1記載の医薬製剤。

【請求項4】 使用時にHGFとヘパリンとを混
合して調製される請求項1から4のいずれかに記載の医
薬製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、HGF (Hepatocyto Gr
owth Factor、肝細胞増殖因子)を含有する医薬製剤に関
し、より詳細にはHGFの作用時間の持続性を図ること
のできる医薬製剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 HGFは、中村らにより発見された、成
熟肝細胞に対して最も強力な増殖促進活性を持つ生理活
性ペプチドであり (例えば、Biochem. Biophys. Res. C
ommun., 122, 1450, 1984, FEBS Letter, 22, 311, 198
7など参照)、近年生物工学的的手法により量産が可能に
なった (例えば、Nature, 342, 440, 1989, Proc. Nat
l. Acad. Sci. USA, 87, 3200, 1990, Biochem. Biophy
s. Res. Commun., 172, 321, 1990など参照)。本因子
は、肝炎や肝硬変のみならず、腎炎や癌などに対する治
療・予防薬として、また制癌剤の副作用抑制剤や創傷治
療剤などへの適用が期待されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 上述のように、HGF
は医薬品としての利用が期待されている物質であるが、
本因子を単独で投与しても半減期数分で血中から消失す
ることが、本因子を医薬品として開発していく上での大
きな障害となっていた。因に、本因子の血中よりのクリ
アランスに関わる主要臓器は肝臓であることも既に知ら
れている。本因子は高分子ペプチドであり、例えば、注
射剤として患者に投与されることになるが、半減期の短
い薬剤はそのままでは頻回投与が持続投与を余儀なくさ
れる。従って、患者は治療に当たって、持続性の長い薬
剤に比べてより大きな苦痛を強いられることになる。ま
た、血中からのクリアランスが速ければ大量の薬剤投与
が必要となり、医療費の高騰を招来するとともに大量に
本因子を生産することが必要になる。一般的な製剤技術
でこの点を克服しようとする試みもあるが、本因子の特
性に対応して設計されたものではなく、十分な効果は得
られていない。本発明は上記の課題を解決すべくなされ
たもので、本発明の目的は、HGFの生物活性を維持さ
せたままで、血中からのクリアランスを低下させ、本因
子の作用持続時間を延長させることのできる製剤を提供
することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 上記の課題を解決するた
め、本発明者らはHGFの作用時間を持続させることを
鋭意検討したところ、HGFの持つヘパリン親和性の特
性を考慮してHGFとヘパリンとを併用すること、即ち
HGFとヘパリンの複合体を形成させることにより、血
中よりのHGFのクリアランスを低下させ得ることを見
出した。また、当該複合体の形成がHGFの持つ生物活
性の発現に支障を与えないことも確認した。本発明はか
かる知見に基づいてなされたものである。即ち、本発明
の医薬製剤は、HGFとヘパリンを含有することからな
る。

【0005】 上記の構成からなる本発明の有効成分であ
るHGFは、医薬として使用できる程度に精製されたも
のであれば、種々の方法で調製されたものを用いること
ができる。HGFの調製方法としては、各種の方法が知
られており、例えば、ラット、ウシ、ウマ、ヒツジなど
の哺乳動物の肝臓、脾臓、肺臓、骨髓、脳、腎臓、胎盤
等の臓器、血小板、白血球等の血液細胞や血漿、血清な
どから抽出、精製して得ることができる。また、HGF
を産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養物

(培養上清、培養細胞など)から分離精製してHGFを
得ることもできる。あるいは遺伝子工学的的手法によりH
GFをコードする遺伝子を適切なベクターに組込み、こ
れを適当な宿主に挿入して形質転換し、この形質転換体
の培養物から目的とする組換えHGFを得ることができ
る (例えば、Nature, 342, 440, 1989など参照)。上記の
宿主細胞は特に限定されず、従来から遺伝子工学的の手
法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、枯草
菌、酵母、糸状菌、植物又は動物細胞などを用いること
ができる。

【0006】 より具体的には、HGFを生体組織から抽
出精製する方法としては、例えば、ラットに四塩化炭素
を腹腔内投与し、肝炎状態にしたラットの肝臓を摘出し
て粉碎し、S-セファロース、ヘパリンセファロースな
どのゲルカラムクロマトグラフィー、HPLC等の通常
の蛋白質精製法にて精製することができる。また、遺伝
子組換え法を用い、ヒトHGFのアミノ酸配列をコード
する遺伝子を、ウレパピローマウィルスDNAなどのベ
クターに組み込んだ発現ベクターによって動物細胞、例
えば、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、マ
ウスC127細胞、サルCOS細胞などを形質転換し、
その培養上清より得ることができる。

【0007】 かくして得られたHGFは、そのアミノ酸
配列の一部が欠失又は他のアミノ酸により置換されてい
たり、他のアミノ酸配列が一部挿入されていたり、N末
端及びC又はC末端に1又は2以上のアミノ酸が結合し
ていたり、あるいは糖鎖が同様に欠失又は置換されてい
てもよい。かかるHGF同効物としては、例えば、特開

51号公報などに記載の物質が挙げられ、これらも本発明に適用でき、本発明の範囲に含まれる。

【0008】本発明の他の成分であるヘパリンとしては、医薬として使用できる程度に精製されたものであればいずれのものも用いることができ、その由来（例えば、ウシ、ゾウなど）も特に限定されない。また、使用されるヘパリンの分子量も特に限定されず、高分子量ヘパリン、低分子量ヘパリン及びそれらの混合物のいずれも使用することができる。HGFに対するヘパリンの使用割合としては、HGF 1 μ mol に対して、ヘパリンを0.01~50mg程度とされる。ヘパリンの使用量が0.01mg未満では十分なHGFクリアランス低下効果を発現できないことがあり、また50mgを超えても問題はないがそれまでの量で効果を発揮できるので、その量を超えて加える必要性は少ない。

【0009】本発明の目的は、予め調製されたHGF及びヘパリンを含有する製剤を投与するか、又はHGFとヘパリンを含む製剤を用時に調製して投与することにより達成される。適用症状としては、肝炎、肝硬変、腎炎、癌などの治療・予防、制癌剤の副作用抑制、創傷治療の促進などが挙げられる。

【0010】本発明の製剤は種々の製剤形態（例えば、液剤、固形剤、カプセル剤など）をとりうるが、一般的には有効成分であるHGF及びヘパリンのみ又はそれらと慣用の担体と共に注射剤とされるか、又は慣用の担体と共に外用薬とされる。当該注射剤は常法により調製することができ、例えば、HGF及びヘパリンを適切な溶剤（例えば、滅菌水、緩衝液、生理食塩水等）に溶解した後、フィルター等で濾過して滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。注射剤中のHGF含量としては、通常0.0002~0.2(W/V%)程度、好ましくは0.001~0.1(W/V%)程度に調整され、ヘパリン含量はHGF含量に応じて適宜調整される。また、外用薬としては、例えば、軟膏状、ゲル状、液状などの剤形に製剤化され、製剤中のHGF含量は、外用薬の適用疾患、適用部位などに応じて適宜調整することができる。製剤化に際して、好ましくは安定化剤が添加され、安定化剤としては、例えば、アルブミン、グロブリン、ゼラチン、マンニトール、グルコース、デキストラン、エチレングリコールなどが挙げられる。さらに、本発明の製剤は製剤化に必要な添加物、例えば、賦形剤、溶解補助剤、酸化防止剤、無痛化剤、等張化剤等を含んでもよい。液状製剤とした場合は凍結保存、又は凍結乾燥等により水分を除去して保存するのが望ましい。凍結乾燥製剤は、用時に注射用蒸留水などを加え、再溶解して使用される。

【0011】本発明の製剤は、該製剤の形態に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、注射剤の形態にして静脈、動脈、皮下、筋肉内等に投与することか

より適宜調整されるが、通常HGFとして0.01mg~100mgであり、これを1日1回ないし数回に分けて投与するのが適当である。

【0012】

【実施例】以下、実施例及び試験例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。なお、以下に述べる実施例では中村らの総説（例えば、Critical Reviews in Oncogenesis, 3, 27-54, 1992、代謝 28, 599-608, 1991など参照）に述べられているタイプ1のHGFを使用した。既にタイプ2及びタイプ3のHGFもタイプ1のHGFと同等の活性を有することが知られており、タイプ2及びタイプ3並びに各タイプの誘導体を用いても同様の効果が得られることは明らかである。

【0013】実施例1

生理食塩水100ml中にHGF 1mg、ヘパリン4g、マンニトール1g及びポリソルベート80 10mgを含む溶液を無菌的に調製し、バイアル瓶に1mlずつ無菌的に分注し、常法に準じて凍結乾燥し、凍結乾燥製剤を得た。

【0014】実施例2

0.15M NaClと0.01%ポリソルベート80を含むpH7.4の0.02Mリン酸緩衝液100mlに、HGF 1mg、ヘパリン4g及びヒト血清アルブミン100mgを添加した水溶液を無菌的に調製し、バイアル瓶に1mlずつ無菌的に分注し、常法に準じて凍結乾燥し、凍結乾燥製剤を得た。

【0015】以下、試験例に基づいて、本発明を説明する。なお、試験に用いたヘパリンは以下のとおりである。

高分子量ヘパリン：シグマ製、製品番号H 7005〔ナトリウム塩、グレードII、ブタ腸粘膜由来、分子量：250000-350000（レーザー光散法）、180000-230000（ゲル濾過法）〕

低分子量ヘパリン：シグマ社製、製品番号H 5640（ナトリウム塩、ブタ腸粘膜由来、分子量：40000-60000）

【0016】試験例1

ラット肝臓にHGF-ヘパリン複合体を灌流したときの流出液中に出現した放射活性の割合及び肝抽出率

1で標識したトレーサー濃度（0.8 pM）のHGFのみ、及びこの標品とそれぞれ0.1mg/ml、1mg/ml、3mg/mlの高分子量ヘパリンをそれぞれ混合した後、室温で50分インキュベートして作成した各複合体をラットに一回通過で灌流させた（灌流速度、12ml/分）。灌流液は20%（V/V）の牛赤血球、2%（W/V）の牛血清アルブミン（BSA）、5mMグルコースを含む中性緩衝液〔120mM NaCl、4.8mM KCl、1mM KH_2PO_4 、1.2mM MgSO_4 、2.2mM CaCl_2 、20mM MES（pH7.4）〕を用いた。流入液中のトリクロル酢酸（TCA）沈殿性の放射活性に対する肝静脈中

のTCA-沈殿性の放射活性の割合の時間推移(図1左側)及びその肝抽出率(図1右側)を測定した。なお、肝抽出率は、定常状態下での(流入液中放射能/肝静脈中放射能) × (流入液中放射能)より計算した。図1に示されるように、1mg/ml以上のヘパリンと混合したとき、肝抽出率が顕著に低下した。また、HGFの血中からのクリアランスに関わる主要臓器が肝臓であることを併せ考えると、*in vivo*条件でも、ヘパリンによりHGFの血中からのクリアランスも顕著に低下することが示唆された。

【0017】試験例2

¹²⁵I-HGF-ヘパリン複合体を静注したときの血漿中TCA沈殿性放射活性の時間推移

¹²⁵Iで標識したトレーサー濃度(500pM)のHGFのみ、及びこの標品とそれぞれ20mg/ml、40mg/ml、80mg/mlの高分子量ヘパリン、あるいは80mg/mlの低分子量ヘパリンをそれぞれ混合した後、室温で50分インキュベートして作成した各複合体を、ラットに大腿静脈より約0.25ml静注した。次いで、大腿動脈より採血を行い、血漿中TCA-沈殿性放射濃度の推移を測定した。なお、この条件下では、HGFの投与量は、0.13pmol/ラット、ヘパリンの投与量は、高分子量ヘパリンでそれぞれ、5mg/ラット、10mg/ラット、20mg/ラット、及び低分子量ヘパリンで、20mg/ラットに相当する。得られた結果を図2に示す。なお、結果として得られた血漿中濃度を投与量で規格化して示した。図2に示されるように、高分子量ヘパリンでは5mg/ラット以上、低分子ヘパリンでは20mg/ラットで著明な血中からのHGFクリアランスの低下がみられた。

【0018】試験例3

HGFによる初代培養肝細胞のDNA合成促進(HGFとの接触時間の影響)

コラゲナーゼ灌流法により調製したラット遊離肝細胞(2.5×10⁶細胞/ml)を、培養用ディッシュに1cm²当りの細胞数が7×10⁶個になるように入れ、Williams' medium E培地(1nMインスリン、1nMデキサメサゾン、5%(V/V)胎牛血清、30mg/mlカナマイシン、モノサルフェートを含む)中で24時間培養した。途中、培養開始2時間後に同じ培地の新鮮なものに交換した。培養開始24時間後に、培地をWilliams' medium E培地(1nMインスリン、1nMデキサメサゾン、5U/mlアプロチニン、30mg/mlカナマイシン、モノサルフェートを含む)に交換するとともに、HGF(0-250pM)を種々の時間(0、3-28時間)インキュベートした後に細胞を洗浄し、同培養用メディウムを加え、合計28時間になるまでインキュベートを続けた。インキュベーションの途中22時間後に、³H-デオキシウリジン(採取濃度、0.3μCi/ml、0-14nM)を非標識体

(最終濃度、480nM)と共に加えた。28時間後(³H-デオキシウリジン添加6時間後)に、³H-デオキシウリジンの取り込み量を測定することによりDNA合成を評価した。その結果を図3に示した。なお、結果は、90pMのHGFを28時間接触させたときに得られた最大活性を100として表した。図3から明らかのように、HGFと標的細胞である肝細胞との接触時間が長いほどDNA合成が増大していた。このことは、HGFを血中により長時間にわたって存在させた方が、その有効性の増強につながることを示している。

【0019】試験例4

HGF-ヘパリン複合体による初代培養肝細胞のDNA合成

HGF1nM又は12.5nMと、ヘパリン(濃度、0-100mg/ml)を室温で50分間ブレインキュベートして、複合体を形成させた。この混合溶液20μlを、試験例3に示した培地500μl中の培養肝細胞に加え、28時間インキュベートした。従って、培地中での最終濃度としては、HGFで約40pM及び500pM、ヘパリンで0-4mg/mlとなるように加えた。途中、HGF-ヘパリン混合液添加22時間後に、試験例3と同様に³H-デオキシウリジンを添加し、DNA合成能を測定した。その結果を図4に示す。なお、図4においては、ヘパリン非存在下のDNA合成能を100とし、それに対する割合(%)で表示した。図4から明らかなように、高濃度のヘパリンとの複合体でも十分に高い生物活性がされていた。因に、試験例2で示されたHGFの血中クリアランス低下に十分な10mg/ラットというヘパリンの量は、循環血漿の容積(約10ml/ラット)を考慮すると、ほぼ1mg/mlに相当する。

【0020】試験例5

¹²⁵I-HGF静注後にヘパリンを静注したときの血漿中TCA沈殿性放射活性の時間推移

正常ラット及び四塩化炭素処理ラット(オリーブ油で10倍に希釈した四塩化炭素を、ラット腹腔に1ml/100g体重投与し、24時間後のラットを用いた)に、¹²⁵I-標識したトレーサー量(0.13pmol/ラット)のHGFを大腿静脈より静注した後11-16分後に高分子量ヘパリンを種々の投与量(0、10、25、50mg/ラット)で静注したときの血漿中のTCA-沈殿性放射活性の時間推移を測定した。なお、採血は大腿動脈より行った。図5に、正常ラットに¹²⁵I-HGFを静注後、16分してヘパリンを静注したときの血漿中のTCA沈殿性放射活性の時間推移を示す。また、図6に、正常ラット(コントロール)及び四塩化炭素処理ラットに¹²⁵I-HGFを静注後、11分してヘパリン(25mg/ラット)を静注したときの血漿中のTCA沈殿性放射活性の時間推移を示す。図5及び6に示されるように、ヘパリン投与により¹²⁵I-HGFの

血漿中濃度が一過的に上昇することが明らかである。この理由としては、ヘパリンによりHGFの血中クリアランスが低下すること、及び各組織表面に結合している $\alpha 1$ -HGFがヘパリンにより除去され循環血中に移行することの両原因が考えられる。ここで、重要なことは、四塩化炭素処理をして肝炎惹起ラットでも正常ラットと同様なヘパリンの効果がみられている点である。

【0021】

【発明の効果】以上説明したように、HGFをヘパリンと混合して複合体を形成させることにより、さらに通常用いられる各種の賦形剤や安定化剤を添加することで、低用量で有効な持続性のあるHGF含有医薬品を得ることができる。従って、本発明によれば、投与回数及び投与量を低減できるので、患者の苦痛の緩和、医療費の低減などを図ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】ラット肝臓にHGF-ヘパリン複合体を灌流したときの流出液中に出現した放射活性の割合（左側）及*

*び肝抽出率（右側）を示す図である。

【図2】 $\alpha 1$ -HGF-ヘパリン複合体を静注したときの血漿中TCA沈殿性放射活性の時間推移を示す図である。

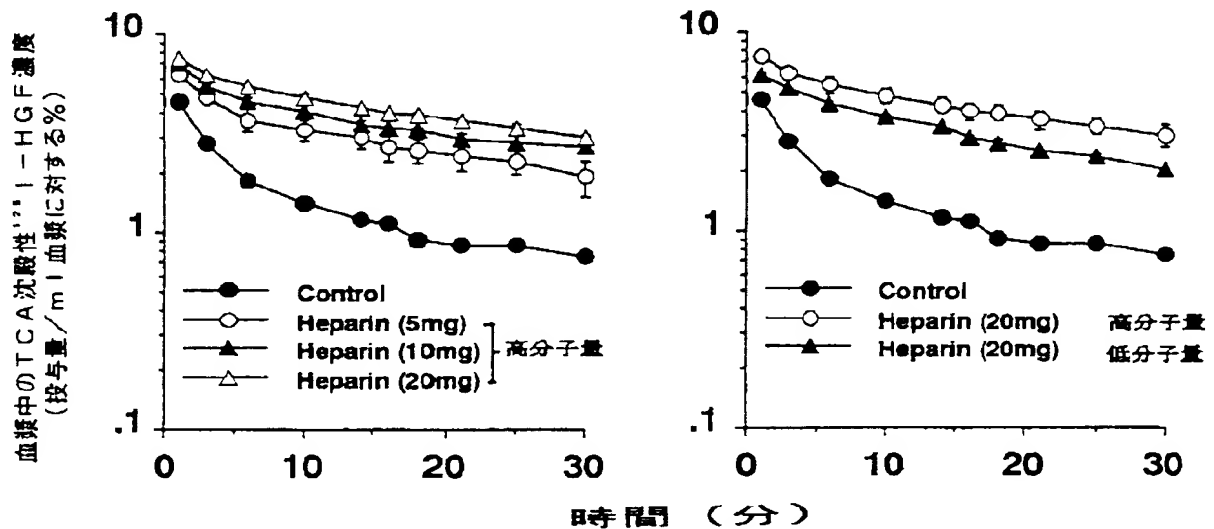
【図3】HGFによる初代培養肝細胞のDNA合成促進におけるHGFとの接触時間の影響を示す図である。

【図4】HGF-ヘパリン複合体による初代培養肝細胞のDNA合成を示す図である。左側の図はHGF濃度40 pMの場合を、右側の図はHGF濃度500 pMの場合を示す。

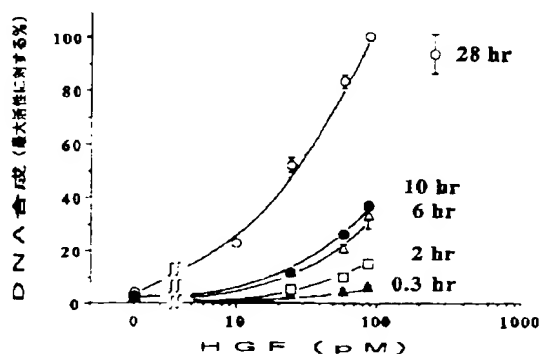
【図5】正常ラットに $\alpha 1$ -HGFを静注後、16分してヘパリンを静注したときの血漿中のTCA沈殿性放射活性の時間推移を示す図である。

【図6】正常ラット（コントロール）及び四塩化炭素処理ラットに $\alpha 1$ -HGFを静注後、11分してヘパリン（25 mg/ラット）を静注したときの血漿中のTCA沈殿性放射活性の時間推移を示す図である。

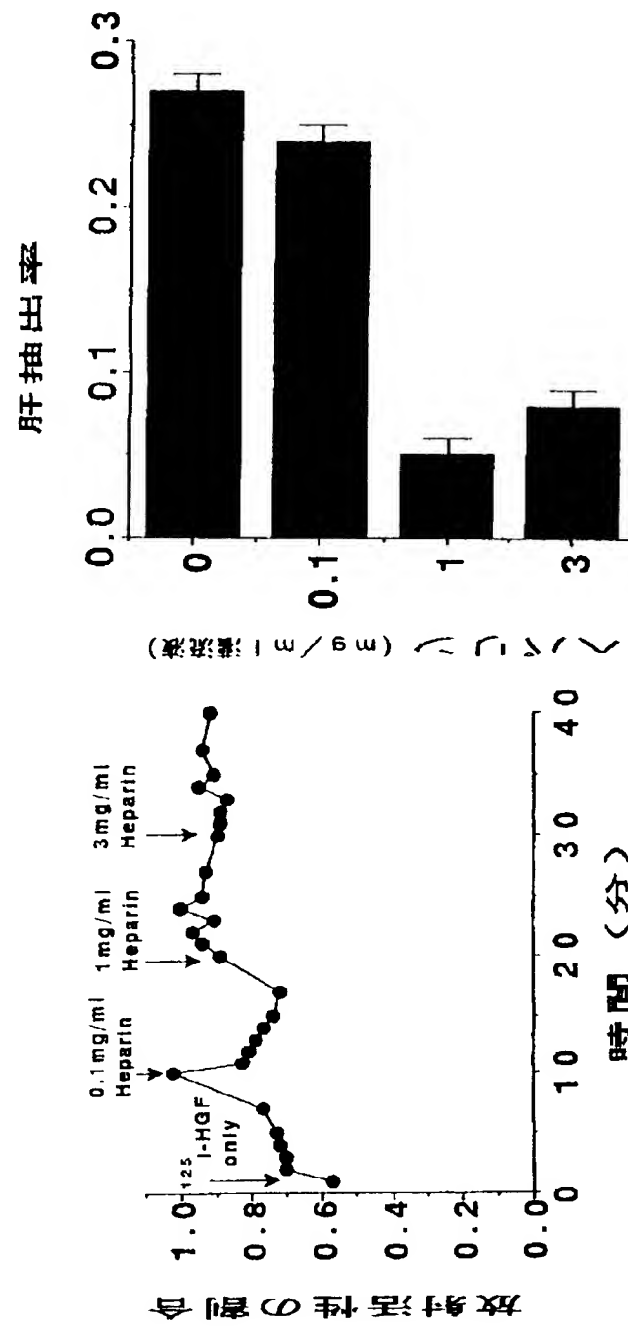
【図2】



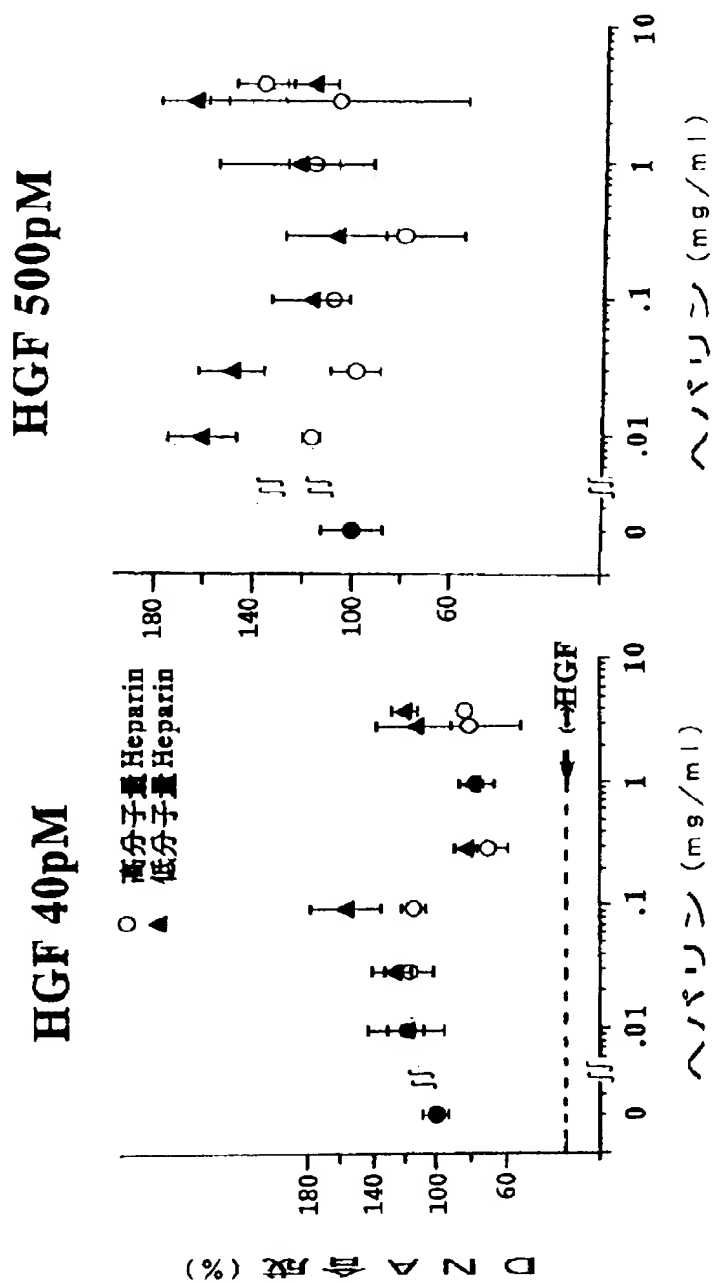
【図3】



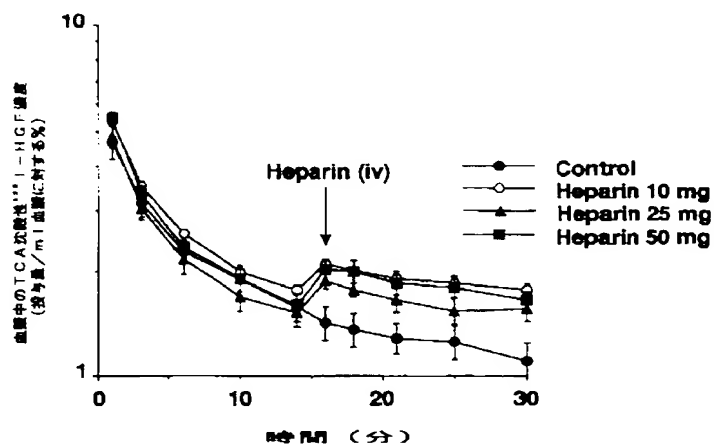
【図1】



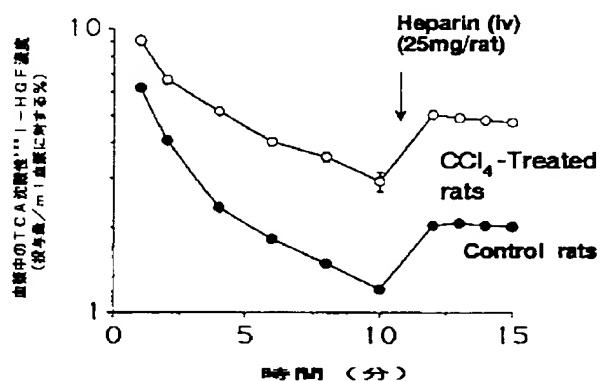
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(72)発明者 杉山 雄一

東京都武蔵野市西久保3丁目4番10号

(72)発明者 花野 学

船橋市松ヶ丘1丁目24番3号